DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.027
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

文章编号:1000-5404(2001)11-1309-03

论著

鼠牙乳头细胞核心结合因子 cDNA 片段的克隆与序列测定

郭红延,吴补领,郭希民,陆怀秀,余 擎 (第四军医大学口腔医学院牙体科,西安 710032)

提 要:目的 从培养的大鼠牙乳头细胞中克隆核心结合因子(cbfa1)的 cDNA 片段。方法 原代培养大鼠牙乳头细胞,提取培养细胞的总 RNA,逆转录合成 cDNA,用 PCR 的方法扩增 cbfa1 基因片段。将获得的预期大小的 PCR 产物插入 pUC18 克隆载体中,转化 TOP10 感受态细胞,蓝白筛选白色克隆,进行体外扩增,提取质粒进行酶切鉴定,含目的插段的克隆在 PE317-A 自动测序仪上进行序列测定。结果 从培养的鼠牙乳头细胞提取的总 RNA 中成功克隆出691 bp cbfa1 基因片段,测序结果和 GenBank 报道序列完全一致。结论 从鼠牙乳头细胞中成功克隆到 cbfa1 基因片段,确切的证实了核心结合因子(cbfa1)基因在鼠牙乳头细胞中的表达。

关键词:cbfa1;鼠牙乳头细胞;PCR
中图法分类号:R322.41;R394-33 文献标识码:A

Cloning and sequencing of rat cbfa1 cDNA fragment from dental papilla cell

GUO Hong-yan, WU Bu-ling, GUO Xi-min, LU Huai-xiu, YU Qing (School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To clone the complementary cDNA fragment of cbfa1 from dental papilla cell of rat. Methods Total RNA was extracted from primary culture of rat dental papilla cells and subsequently reversely transcripted into cDNA followed by polymerase chain reaction (PCR) to trap the cDNA fragment of interest. The PCR product of expected size was then inserted into cloning vector pUC19a and transformed into TOP10 host strains for amplification. Positive recombinant clones were screened out by white-blue selection and restriction analysis for sequencing in PE317-A automatic DNA sequencer. Results A 691bp cDNA fragment was cloned from the total RNA of rat dental papilla cell and proved to be identical to the rat cbfa1 sequence recorded in GenBank. Conclusion Rat cbfa1 cDNA fragment is successfully cloned from rat dental papilla cells and proues the expression of cbfa1 gene in rat dental papilla cells.

Key words: cbfa1; dental papilla cell; PCR

核心结合因子(Core-binding factor α1, cbfa1),又称成骨细胞特异性转录因子(Osteoblast-specific transcription factor 2, OSF2),是一种与成骨细胞分化关系密切的转录因子。其在脊椎和无脊椎动物的器官发育,尤其是骨形成过程中扮演着重要的角色。因 cbfa1 基因中包含与果蝇属 runt 区域高度同源性的 DNA 结合区域即 runt 结构域,又被归为 runt 结构域基因家族成员[1]。目前,对于 cbfa1 的研究主要集中在其对成骨细胞分化的作用机制上。对其在牙齿发育过程中的作用机制研究甚少。本研究采用 RT-PCR 的方法从培养的大鼠牙乳头细胞中克隆 cbfa1 的 cDNA 片段并测定序列,旨在确切地证明鼠的牙乳头细胞中有 cbfa1 基因的表达,并为进一步研究其功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 组织块法原代培养大鼠牙乳头细胞

选择生后6 d SD 仔鼠 4 只,脱颈处死,浸入 75% 酒精消毒 30 min,超净台内断头,头带放大镜下于牙槽脊处用挖匙挑出小米粒大牙乳头组织,无菌培养皿内剪成 1 mm×1 mm×1 mm 大小组织块,用探针均匀铺于瓶底,加入 5 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,于 37 ℃二氧化碳孵箱内倒置 2 h,反转继续培养,取 5~8 代细胞用于实验。胎牛血清及 DMEM 培养液均来自 GIBCO(USA)。

1.2 大鼠牙乳头细胞总 RNA 的提取

收集第 5~8 代培养的细胞约 1×10^6,用总 RNA 提取试剂盒(Total RNA Extraction System,华美公司)提取总 RNA,溶于 35 μl 去离子水中,取 5 μl 进行 100 倍稀释,DU70 型分光光度仪分别测定样品在 260 nm 和 280 nm 波长的光密度值,计算 RNA 的浓度。

1.3 RT-PCR

通过 GenBank 检索 cbfa1 序列,根据引物设计原则,选取编码区 700 bp 左右片段,用 Primer 引物设计软件进行引物设计,设计结果为:P1:5'-gtgtcagcaaagcttcttttgg-3',内含 *Hind* Ⅲ酶切位点;P2:5'-atcaagcttctgtctgtgcctt-3',内含 *Hind* Ⅲ酶切位点。用 Superscript™试剂盒对所提取的总 RNA 进行逆转录,合成 cDNA 第一条链,然后以其为模板用 Gradient PCR 仪进行 PCR。在 200 μl 的 PCR 反应专用管中依次加入 10×PCR Buffer 5 μl,dNTPs(10 mmol/L each)1 μl,P1(100 pmol/μl)1 μl,P2(100 pmol/μl)1 μl,Genomic DNA 10 μl,加无菌去离子水至 50 μl。沸水中变性 10 min,取出迅速置冰水中,加入 Taq DNA 聚合酶 0.5 μl,置 Gradient PCR 仪中,程序:94 ℃ 4 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,5 cycles;94 ℃ 30 s,68 ℃ 1.5 min,30 cycles;72 ℃ 10 min。反应结束后,取样品电泳,观察扩增产物。

1.4 PCR 产物的回收与序列测定

PCR 产物于琼脂糖凝胶上电泳,切取目的基因阳性凝胶块,用 Advantage™ PCR-Pure kit(Clontech Labratories Inc. USA)回收进行回收,*Hind* Ⅲ分别对回收的目的基因和载体 pUC18 进行

基金项目:高等学校骨干教师资助计划资助项目
作者简介:郭红延(1970-),男,辽宁省丹东人,硕士,主治医师,主要从事牙髓生物学及牙齿发育相关方面的研究。电话:(029)3373219
收稿日期:2001-01-03;修回日期:2001-04-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

单酶切，连接目的基因和载体，转化 TOP10 感受态宿主菌，用 X-gal+ IPTG 进行蓝白筛选白色克隆，挑选出的阳性克隆摇菌扩增，提取质粒后，*Hind* Ⅲ酶切鉴定。经过鉴定证实的质粒用 PE317-A 型 DNA 自动测序仪（PE 公司，USA）测定 cDNA 序列。

2 结果

2.1 大鼠牙乳头细胞的培养及鉴定

原代培养后第 2 天即可见有梭形细胞及多角形细胞从组织块边缘游出，以组织块为中心呈放射状排列，经 2～3 次传代后，多角形细胞消失，培养细胞均为梭形细胞。传至 5～8 代，细胞长势良好，大多呈长梭形，伸展良好，胞浆均匀，核圆，核仁清晰。用抗波形丝蛋白和角蛋白的抗体 ABC 免疫组化染色，细胞呈波形丝蛋白阳性，角蛋白阴性，提示细胞为成纤维样细胞。约 2 周时原代细胞长满培养瓶底部。取 5～8 代细胞用于实验。

2.2 总 RNA 的提取结果

用分光光度法测定 RNA 纯度和含量，结果：A_{260}＝0.362，A_{280}＝0.185，$OD_{A260/A280}$＝1.956，总 RNA 浓度为 1.774 g/L，说明获得了浓度及纯度均较高的总 RNA。

2.3 RT-PCR 产物电泳结果

采用 RT-PCR 方法从大鼠牙乳头细胞总 RNA 中扩增 cbfa1 基因片段，于 10 g/L 低熔点琼脂糖凝胶电泳，可见大小约 691 bp 扩增产物条带，大小与预计相同，见图 1。

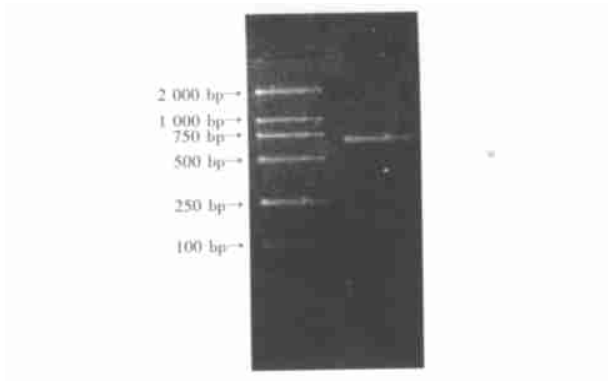


图 1 PCR 扩增产物（约 691 bp）

Fig 1 Product of RT-PCR (about 691 bp)

mark: DNA Marker DL2 000 (100, 250, 500, 750, 1 000, 2 000 bp)

2.4 序列测定结果

PE317-A 型自动测序仪测定 pUC18 中插入的目的插段核苷酸序列，结果与 GenBank 中报道的 cbfa1 片段完全一致，无差错，见图 2。

```
TCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCTTTTGGGATCCGAGCACCAGCCGGCGCTTCAGCC
          10        20        30        40        50        60        70        80
CCCCCTCCAGCAGCCTGCAGCCCGGCAAGATGAGCGACGTGAGCCCGGTGGTGGCTGCGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAG
       90       100       110       120       130       140       150       160
CAGCAGCAACAGCAGCAGCAACAACAGCAACAGCAACAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGAGGCGGCCGCAGCAGCAG
    170       180       190       200       210       220       230       240
CGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCAGCGGCGGCGGCCGCAGTGCCCCGATTGAGGCCGCCGCACGACAACCGCACCATGGTG
  250       260       270       280       290       300       310       320
GAGATCATCGCGGACCACCCGGCCGAACTGGTCCGCACCGACAGTCCCAACTTCCTGTGCTCCGTGCTGCCCTCGCACTGG
  330       340       350       360       370       380       390       400
CGGTGCAACAAGACCCTGCCCGTGGCCTTCAAGGTTGTAGCCCTCGGAGAGGTACCAGATGGGACTGTGGTTACCGTCATGGC
410       420       430       440       450       460       470       480       490
CGGGAATGATGAGAACTACTCCGCCGAGCTCCGAAATGCCTCCGCTGTTATGAAAAACCAAGTAGCCAGGTTCAACGATCTGA
        500       510       520       530       540       550       560       570
GATTGTGGCCGGAGCGGACGAGGCAAGAGTTTCACCTTGACCATAACAGTTTTTACAAAT
    580       590       600       610       620       630
```

图 2 第 42～634 bp 为从鼠牙乳头细胞中克隆出的 CBFA1cDNA 片段测序结果（测序载体为 pUC18）

Fig 2 Results of cbfa1 cDNA sequencing 42— 634 bp cloned from rat dental papilla cell (clone vector was pUC18)

3 讨论

cbfa1 是一种成骨细胞转录因子，可以调节成骨细胞分化、促进Ⅰ型胶原的表达[2～4]。牙齿硬组织与骨组织相似，二者硬组织的形成也有一定的相似之处，在牙齿的形成过程中，cbfa1 是否也同样起到一定的调节作用。D'Souza 等发现在 $cbfa1^{-/-}$ 纯合鼠的牙齿发育过程中，其牙胚发育初期，牙乳头及牙囊各层分化明显，表明此过程的发生并无 cbfa1 的参与。但 $cbfa1^{-/-}$ 纯合鼠出生后其磨牙胚仅发育至帽装期或早期钟状期，而此时 $cbfa1^{+/+}$ 纯合鼠的牙胚发育阶段是钟状期晚期，另外，更有价值的是尽管牙乳头已发育，但成牙本质细胞未见分化。由此可见，cbfa1 对成牙本质细胞的分化也有一定的调节作用[5]。Bronckers 等[6]研究指出，cbfa1 参与了牙冠的形成过程，并证明鼠的成釉细胞中有 cbfa1 的表达。

因为大鼠牙乳头组织取材时，其成釉细胞层较难剥除，如果单纯用大鼠牙乳头组织提取总 RNA 克隆 cbfa1 的 cDNA 片段，难以说明 cbfa1 的确切来源。本研究对鼠牙乳头细胞进行组织块法培养，原代培养时见有多角形上皮样细胞有组织块周围游出，经 2～3 次传代，该多角形细胞消失，所有培养的细胞均为梭形成纤

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

维样细胞，波形丝蛋白和角蛋白染色也证明了这一点。从培养的牙乳头细胞中克隆出 cbfa1 片段，可以避免从组织中克隆 cbfa1 来源的不确定性。

在目前的研究中，cbfa1 在牙齿发育过程中的作用机制较少涉及，仅从 $cbfa1^{-/-}$ 纯合鼠的一些牙齿发育缺陷表现推测其调节机制，本实验所获得的 cbfa1 的 cDNA 片段有助于进一步研究 cbfa1 在牙齿发育过程中的调节机制，为反义核酸转染及 cbfa1 全长的克隆提供了一定的基础。本研究采用 RT-PCR 的方法，成功地从培养的大鼠牙乳头细胞中克隆出 cbfa1 的 cDNA 片段，确切的证实了 cbfa1 基因在鼠牙乳头细胞中的表达。

参考文献：

[1] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, *et al*. Osf2/cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation[J]. Cell, 1997, 89(5): 747—754.

[2] Otto F, Thornell A P, Crompton T, *et al*. Cbfa-1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development[J]. Cell, 1997, 89(5): 765—771.

[3] Komori T, Yagi H, Nomura S, *et al*. Targeted disruption of cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts[J]. Cell, 1997, 89(5): 755—764.

[4] Kern B, Shen J, Starbuck M, *et al*. cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of Type I collagen genes[J]. J Biol Chem, 2000[epub ahead of print]

[5] D'Souza R N, Aberg T, Gaikwad J, *et al*. cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice[J]. Development, 1999, 126(13): 2 911—2 920.

[6] Bronckers A L, Engelse M A, Cavender A, *et al*. Cell-specific patterns of cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues[J]. Mech Dev, 2001, 101(1—2): 255—258.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2001)11-1311-01

个案与短篇

聚丙烯酰胺凝胶注射丰颧部凹陷术后并发症的处理 1 例

Managing a case of complication after polyacrylamide injection for filling zygomatic depression

李刚玉，高应南，王儒鹏 （第三军医大学附属新桥医院皮肤科，重庆 400031）

某女，31 岁。因颧部凹陷于 2001 年 9 月 2 日在一私人美容院行聚丙烯酰胺凝胶注射丰颧部凹陷术，术后立即感到注射部位明显硬肿，局部皮肤感觉迟钝不适。24 h 后感到双侧面颧部肿胀明显，伴头昏头痛，经口服和静滴抗生素（不详）治疗 8 d，肿胀仍未消退，且面色瘀黑发青，注射部位明显发硬肿胀，精神极差。于 2001 年 9 月 10 收入我科。入院后用头孢哌酮 3 g 静滴 1 次/d，术前摄头颅 X 光正侧位片示：双侧颧部眶下可见左面颊有大约 3 cm×3 cm，右侧 2.8 cm×3 cm 的不规则的阴影区。行面颊 B 超示：双眼眶下鼻旁部位均可见填充物，呈不均质弱回声，边界欠清晰，大小分别为：左侧 1.9 cm×0.93 cm，右侧 1.05 cm×0.5 cm，双侧颧部皮下亦可见类似回声填充物，左侧大小为 1.31 cm×0.78 cm，右侧 1.05 cm×0.8 cm，B 超诊断：双侧面颊部皮下填充物伴周围组织炎性反应。查血 Rt 示：HB：14.2×10^9/L，WBC：9.1×10^9/L，RBC：4.45×10^9/L，N：78%，L：22%，在确定填充物的大小范围深度后，于次日常规消毒铺巾，用 1%的利多卡因各 3 ml 在双侧面颧硬肿部位皮下局麻，沿皮纹方向作斜形切口，长约 0.8 cm，切开皮肤皮下立即有暗红色脓性液体流出，每侧大约有 20 ml 左右，（取少许液体作培养＋药敏）。边挤压边用纹钳或刮匙刮出，然后用盐水冲洗囊腔几遍，见清亮后用庆大霉素 2 支 16 万 u 稀释后再冲洗囊腔内，伤口内置象皮引流条一根，术后即可见眶下硬肿明显消退，伤口敷料加压包扎。术后仍用头孢哌酮静滴，第 2 天脓液培养示："培养物为无孢子菌生长"，然后加用斯皮仁诺 0.2 g 口服每日 1 次，术后 24 h 拔掉引流条，伤口用 6-0 丝线缝合一针，敷料加压包扎，术后第 3 天发现左侧眶下近内眦部有大约 1 cm×1 cm 大小的硬块，考虑是填充物未完全刮出，在局麻下行 2 次手术，在内眦部睑缘下作横切口约 1 cm，切开皮下后，纹钳分离到肿块部后，用刮匙刮出一点颗粒状凝胶和一点肉芽肿后，硬肿块消除，术后治疗同前不变。因所做切口均是按皮纹方向的小切口，术后加压包扎，故伤口愈合好，疤痕非常小，效果非常满意。术后 10 d 痊愈出院。

体会

聚丙烯酰是一种亲水性强、无色透明的聚合类水凝胶[1]，对组织是无毒的，而且具有良好的生物相容性，但其 PAM 在合成中残留的丙烯酰胺单体有使神经及肌肉功能失调的毒性，并对皮肤有刺激性[2]。作为全新的整型填充材料，在国内已使用 4 年的时间，但并发症时有发生，并发症的发生主要与操作技术和术后护理以及凝胶的质量相关，虽然创伤小，操作简单，但必须是经过正规培训在正规医院严格无菌操作下进行，我们该例病案明显达不到要求，而脓液培养为无孢子菌是霉菌的一种，考虑是操作不规范或消毒不严所致，经及时切开引流冲洗抗炎等处理均能治愈。但术前定位及手术采用皮纹方向的小切口是取得满意效果的关键。

关键词：聚丙烯酰胺凝胶；半颧部凹陷；并发症
中图法分类号：R622 文献标识码：B

参考文献：

[1] 罗致诚. 生物医学工程学[M]. 上海，上海科学技术出版社，1989. 150—151.

[2] 高景恒，曹孟君，鲁开化. 医用聚丙烯酰胺水凝胶的研制开发与临床应用[J]. 实用美容整型外科杂志，2001，12(2)：57—59.

（编辑 张大春）

作者简介：李刚玉(1955—)，女，朝鲜族，吉林省长春市人，副主任医师，主要从事整形美容方面的研究，发表论文 8 篇。电话：(023)54000-74647

收稿日期：2001-04-20；修回日期：2001-08-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net